

18/5/8
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009177505

WPI Acc No: 1992-304940/199237

XRAM Acc No: C92-135798

Synthetic gene for prepn. of human serum albumin - comprises synthetic DNA contg. gene coding the albumin using coding in Escherichia coli

Patent Assignee: AJINOMOTO KK (AJIN)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4211375	A	19920803	JP 9114600	A	19910205	199237 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9025682 A 19900205

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 4211375	A		37	C12N-015/14	

Abstract (Basic): JP 4211375 A

A synthetic DNA contg. a gene coding human serum albumin (I) designed by frequently using codons used frequently in E coli, pref. having a specified restriction enzyme map, is new. A plasmid contg. the above synthetic DNA, a microbe transformed by the plasmid, and the prepn. of (I) in which the microbe is cultured in medium and (I) is isolated from the microbe body or the culture, are claimed.

USE/ADVANTAGE - (I) productivity in E coli is enhanced

Dwg.0/0

Title Terms: SYNTHETIC; GENE; PREPARATION; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; COMPRISE; SYNTHETIC; DNA; CONTAIN; GENE; CODE; ALBUMIN; CODE; ESCHERICHIA; COLI

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/14

International Patent Class (Additional): C12N-001/21; C12P-021/02;

C12R-001-19; C12R-001-125; C12R-001-08

File Segment: CPI

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-211375

(43) 公開日 平成4年(1992)8月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/14	Z N A	7236-4B		
1/21				
C 1 2 P 21/02	C	8214-4B		
// (C 1 2 N 1/21		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数9(全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-14600

(22) 出願日 平成3年(1991)2月5日

(31) 優先権主張番号 特願平2-25682

(32) 優先日 平2(1990)2月5日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 橋口 賢一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の

素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 児島 宏之

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の

素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 山田 和彦

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の

素株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外4名)

(54) 【発明の名称】 合成遺伝子及びそれを用いたヒト血清アルブミンの製造法

(57) 【要約】

【構成】大腸菌で多用されるコドンを用いて設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNAを構築する。この合成DNAをプラスミドに組み込み、微生物に導入して該微生物を形質転換する。最後に、この形質転換体を培地中で培養し、その菌体内または培地中からヒト血清アルブミンを単離する。

【効果】大腸菌等におけるヒト血清アルブミン生産量を飛躍的に増加させることができる。

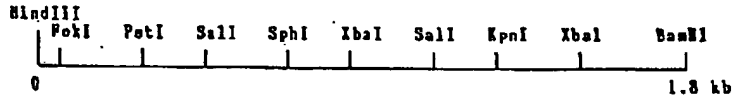
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌で多用されるコドンを用いて設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNA。

【請求項2】 合成DNAがヒト血清アルブミン蛋白の*



*N末端付近をコードする領域に単一の制限酵素切断部位を保持することを特徴とする請求項1記載の合成DNA。

【請求項3】 合成DNAが下記に示す制限酵素地図を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項4】 合成DNAが配列表の配列番号1で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項5】 合成DNAが配列表の配列番号2で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項6】 請求項1ないし5記載の合成DNAを含む有するプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載のプラスミドで形質転換された微生物。

【請求項8】 微生物がエシェリシア・コリ (*E. coli*)、バチルス・サチルス (*B. subtilis*) またはバチルス・ブレビス (*B. brevis*) である請求項7記載の微生物。

【請求項9】 請求項7または8記載の微生物を培地中で培養し、その微生物菌体または培地中からヒト血清アルブミンを単離することを特徴とするヒト血清アルブミンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト血清アルブミン (HSA) をコードする遺伝子を含む合成DNA、合成DNAを有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物を培養してヒト血清アルブミンを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 組換えDNA技術の進歩によって、大腸菌等の微生物において高等真核生物由来の遺伝子を発現させ、その目的遺伝子産物を微生物を培養することによって取得する技術が発展してきた。一般に高等真核生物の遺伝子は、mRNAを調製して、逆転写酵素によって作製したcDNAからクローニングすることによって得られている。ヒト血清アルブミンについても、例えば特開昭58-56684等にcDNAの調製法が開示されている。

【0003】 蛋白質をコードする遺伝子はその蛋白質のアミノ酸配列を1アミノ酸につきDNAの3塩基からなる遺伝暗号 (コドン) によってコードしているが、あるアミノ酸に対応する遺伝暗号は必ずしも1つではない。そして、大量に発現している遺伝子では生物種によって使用されている遺伝暗号に偏りがみられることが知られ

ている。

【0004】 従って、前記の方法で調製されたcDNAからなる遺伝子は高等真核生物において多用される遺伝暗号からなる遺伝子であり、必ずしも大腸菌等の原核生物である微生物における発現に好適なものではない。

【0005】 また、遺伝子を発現させるには適当な発現制御系に接続する必要がある、より好適な発現制御系に接続することによって同じ遺伝子の発現効率を飛躍的に高めることが出来ることが知られている。遺伝子をより好適な発現制御系に接続するためには、遺伝子中に存在する制限酵素部位等が適切に配置されていることが操作しやすく、特にコードする蛋白質のN末端付近の領域に単一の制限酵素部位が存在することが望ましい。しかしながら、cDNAにおいては遺伝子中に存在する制限酵素部位は全くランダムと言ってよく、操作上好適な配置をとっている場合は極めて希である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上述の如く、高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物を培養することによって工業的に有利に生産するためには、目的遺伝子をより好適な発現制御系に接続することとともに、遺伝子本体もまた宿主たる原核生物である微生物においてより効率よく発現するDNA配列を持ったものであることが望まれる。また、より好適な発現系に接続するにあたっての便宜上、適当な制限酵素部位が、適切に配置されていることが望まれる。本発明の目的は、cDNAを用いて高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物に生産せしめる方法の不完全さを是正し、より効率的な遺伝子発現、蛋白質生産を行なうための技術を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、高等真核生物であるヒト由来の蛋白質であるヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物においてより効率的に生産するために、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列をコードするDNA配列を、

①アミノ酸配列を変化させない。

②操作上有用と思われる制限酵素部位を残し、不都合な制限酵素部位を除く。

③目的蛋白質のN末端をコードする領域に単一の有用な制限酵素部位を設ける。

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で多用されている遺伝暗号(コドン)を用いる。

について考慮しながら設計し、化学合成したDNAのオリゴマーから実際にヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物において著量生産させ得る合成DNAを構築するとともに、この合成DNAを含有するプラスミドで形質転換された微生物を培地中で培養することにより目的のヒト血清アルブミンを生産することができ、本発明を完成するに至った。

【0008】さて、cDNAを用いて大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*)等の微生物でヒト血清アルブミンを生成する方法は、特開昭58-56684、特開昭58-150517、特開昭61-275229、特開昭62-215393などに開示されている。しかしこれらは遺伝暗号(コドン)の選択の余地の無いcDNAの持つ性格の故に、その発現効率、従って生産量には自ずと限界があるものである。大腸菌等においてのヒト血清アルブミン生産量の飛躍的な増加は、本発明によって初めて可能となった。また、特開昭62-29985には特定のアミノ酸配列から類推されるDNA配列一般が開示されているが、本発明のアミノ酸配列は特開昭62-29985に開示されているアミノ酸配列とは多くの相違点がある。

【0009】本発明者らは原核生物に適したコドンに注目して、ヒト血清アルブミンをコードするDNAをデザインして化学合成した。

【0010】なお、オリゴヌクレオチドの合成にはトリエステル法(Nuc. Acid. Res. 10, 6553 (1982))や、ホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))等の方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いてもよい。

【0011】また、近年、合成に必要なヌクレオチドや試薬のキット更には自動合成機器も市販されているので、当然これらを用いてもよい。

【0012】次にこの合成DNAを宿主に導入し、増殖、発現させるために適当なプラスミドに組み込む。

【0013】本発明において用いられるプラスミドは特に限定されないが大腸菌を宿主とする場合は通常よく利用されるpSC101、pBR322、pUC19、pUC18、pHSG298、pHSG299、pHSG398、pHSG399等を用いればよい。

【0014】また枯草菌を宿主とする場合には、pUB110、pC194、pE194等を用いればよい。

【0015】パチルス・プレビスを宿主とする場合は、pHY500、pNU200(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589 (1989))等を用いればよい。もちろん、繰り返し述べるが、本発明は上記プラスミドベクターに限定されるもの

ではない。

【0016】次に、このようにして得た組み換えDNAで宿主を形質転換するのである。形質転換法として①細胞を塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウムで処理する方法(塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウム法)、②電気パルスによる方法(エレクトロポレーション法)、③プロトプラストを利用する方法(プロトプラスト法)等の方法があるが、いずれの方法を用いてもよい。またその他の方法を用いてもよい。最後にこの形質転換体を培地中で培養して菌体内に生産もしくは培地中に分泌させ、それを精製するのであるが、このプロセスは通常用いられる以下の方法に従えばよい。

【0017】培地は適当な炭素源、窒素源、無機塩類、使用菌株が特に要求する物質を含んだものを用いればよい。培養時間は使用菌株によって多少異なり特に限定されないが、通常5時間から100時間程度でよい。

【0018】生成物の取り上げ方法は、菌体内に顆粒状に生産させた場合は、集菌後菌体をリゾチーム、超音波等で処理して破碎し、低速遠心によって顆粒を沈澱、採取し、尿素や塩酸グアニジン等で処理して可溶化する。それを希釈や透析等によって巻き戻しを行い、通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。培地に分泌生産した場合は、菌体を除去後、培地から通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。

【0019】以下、本発明を実施例に従って具体的に説明する。

【0020】

【実施例1】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

遺伝子の設計

現在の合成DNA技術と、本発明者らの採用している精製法では安定して得られるDNA鎖は最大70塩基程度である。ヒト血清アルブミンは585アミノ酸であるので1755塩基の遺伝子が少なくとも必要であり、少なくとも25本程度に分割して合成する必要がある。また2本鎖としてプラスミドに組み込む必要があるため、その2倍のDNAを合成する必要がある。またプラスミドに組み込んだ時点で塩基配列の確認が必要なので確実に塩基配列が確認できる長さに分けてプラスミドに組み込む方が操作上都合がよい。従って全体を一度に組み立てるのではなく、8つ程度の部分に分けてフラグメントの集合を行い、そこで塩基配列の確認を行ってから全体を構築することにした。

【0021】以上の前提条件をもとに、

①ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列を変化させない。

②集合させる時に用いる制限酵素の認識部位を必要だけ持たせる。

【0022】(不必要な認識部位を除く。)

③N末端のなるべく近くに遺伝子内で単一の制限酵素部

位を1つ持たせる。(様々な発現システムへ容易に遺伝子を接続することを可能にする。)

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で汎用されている遺伝子暗号をなるべく用いる。

の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある(FEBS LETTERS 58, 134, (1975)、Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982)、J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0023】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考えられること、報告されている年次が新しいことの2つの理由により、アミノ酸配列そのものを決定した文献ではなく、mRNAより作製したcDNAの塩基配列を決定することによってアミノ酸配列を報告している比較的新しい文献、即ち、Nucleic Acids Research 9, 6103 (1981) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7

1, (1982) を主に参考にした。

【0024】しかし、上述の2つの文献に示されたcDNAから類推されるアミノ酸配列にも2ヶ所の相違点がある。すなわち1つは胎児の肝臓から取ったmRNAから類推したもの(Nucleic Acids Research 9, 6103 (1981))、もう1つは成人の肝臓から取ったmRNAから類推したもの(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982))である。

10 【0025】本発明者らは実用性を考えて成人の配列を採用した。コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0026】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図1に示した。

20 【0027】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0028】

【表1】

<u>TTT-Phe 1(0.17%)</u>	<u>TCT-Ser15(2.56%)</u>
TAT-Tyr 0(0.00%)	TGT-Cys 0(0.00%)
<u>TTC-Phe30(5.13%)</u>	<u>TCC-Ser 8(1.37%)</u>
<u>TAC-Tyr18(3.08%)</u>	<u>TGC-Cys35(5.98%)</u>
TTA-Leu 0(0.00%)	TCA-Ser 1(0.17%)
TAA-*** 0(0.00%)	TGA-*** 0(0.00%)
TTG-Leu 0(0.00%)	TCS-Ser 0(0.00%)
TAG-*** 0(0.00%)	<u>TGG-Trp 1(0.17%)</u>
CTT-Leu 3(0.51%)	CCT-Pro 0(0.00%)
CAT-His 0(0.00%)	<u>CET-Arg13(2.22%)</u>
CTC-Leu 1(0.17%)	CCC-Pro 0(0.00%)
<u>CAC-His16(2.74%)</u>	<u>CCG-Arg10(1.71%)</u>
CTA-Leu 3(0.51%)	GCA-Pro 1(0.17%)
CAA-Gln 1(0.17%)	CSA-Arg 1(0.17%)
<u>CTG-Leu54(9.23%)</u>	<u>CCG-Pro23(3.93%)</u>
<u>CAG-Gln19(3.25%)</u>	CGG-Arg 0(0.00%)
ATT-Ile 0(0.00%)	<u>ACT-Thr 7(1.20%)</u>
AAT-Asn 0(0.00%)	ACT-Ser 0(0.00%)
<u>ATC-Ile 8(1.37%)</u>	<u>ACG-Thr21(3.59%)</u>
<u>AAC-Asn17(2.91%)</u>	ACC-Ser 0(0.00%)
ATA-Ile 0(0.00%)	ACA-Thr 0(0.00%)
<u>AAA-Lys58(9.91%)</u>	ACA-Arg 0(0.00%)
<u>ATG-His 8(1.37%)</u>	ACG-Thr 0(0.00%)
AAG-Lys 2(0.34%)	AGC-Arg 0(0.00%)
<u>GTT-Val17(2.91%)</u>	<u>GCT-Ala22(3.76%)</u>
GAT-Asp 1(0.17%)	<u>GGT-Gly 9(1.54%)</u>
GTC-Val 1(0.17%)	GGC-Ala 0(0.00%)
<u>GAG-Asp35(5.98%)</u>	<u>GGC-Gly 3(0.51%)</u>
<u>GTA-Val13(2.22%)</u>	<u>GGA-Ala22(3.76%)</u>
<u>GAA-Glu57(9.74%)</u>	GGA-Gly 0(0.00%)
<u>GTG-Val10(1.71%)</u>	<u>GGG-Ala18(3.08%)</u>
GAG-Glu 4(0.68%)	GGG-Gly 0(0.00%)

【0029】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン（メジャーコドン）と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユーセージに片寄りが見られないシステインのコードである（参考文献：細胞工学，2，1541（1983））。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ

た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0030】

【表2】

TTT-Pho21(3.58%)	TCT-Ser 3(0.51%)
TAT-Tyr12(2.05%)	TGT-Gln15(2.56%)
TTC-Pho10(1.71%)	TCC-Ser 5(0.85%)
TAC-Tyr 6(1.02%)	TGC-Gys20(3.41%)
TTA-Leu10(1.71%)	TCA-Ser 6(1.02%)
TAA-aaa 1(0.17%)	TGA-aaa 0(0.00%)
ITC-Leu12(2.05%)	TCG-Ser 2(0.34%)
TAG-aaa 0(0.00%)	TGG-Trp 1(0.17%)
CTT-Leu18(3.07%)	CCT-Pro10(1.71%)
CAT-Blal1(1.88%)	CGT-Arg 2(0.34%)
CTC-Leu 5(0.85%)	CCC-Pro 6(1.02%)
CAC-Blal 5(0.85%)	CGC-Arg 1(0.17%)
CTA-Leu 4(0.68%)	CCA-Pro 7(1.19%)
CAG-Gln10(1.71%)	CGA-Arg 2(0.34%)
CTG-Leu12(2.05%)	CCG-Pro 1(0.17%)
CAG-Gln10(1.71%)	CGG-Arg 2(0.34%)
ATT-Ile 3(0.51%)	ACT-Thr 7(1.19%)
AAT-Asn10(1.71%)	AGT-Ser 6(1.02%)
ATC-Ile 4(0.68%)	ACC-Thr 7(1.19%)
AAC-Arg 7(1.19%)	AGC-Ser 2(0.34%)
ATA-Ile 1(0.17%)	ACA-Thr12(2.05%)
AAA-Lys41(7.00%)	AGA-Arg13(2.22%)
ATG-Met 6(1.02%)	ACE-Thr 2(0.34%)
AAG-Lys19(3.24%)	AGG-Arg 4(0.68%)
GTT-Val11(1.88%)	GGT-Ala29(4.95%)
GAT-Asp25(4.27%)	GGT-Gly 2(0.34%)
GTC-Val 7(1.19%)	GGC-Ala14(2.39%)
CAC-Asp11(1.88%)	GGC-Gly 3(0.51%)
GTA-Val 7(1.19%)	GCA-Ala17(2.90%)
GAA-Glu37(6.31%)	GGA-Gly 6(1.02%)
GTC-Val16(2.73%)	GGG-Ala 2(0.34%)
GAG-Gln24(4.10%)	GGG-Gly 1(0.17%)

【0031】さて、図1に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0032】FokIは認識部位の9塩基/13塩基(上側鎖/下側鎖)3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0033】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, XbaI, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断点地図を図3に示した。

【0034】DNAの化学合成

設計したDNA配列(図1)を図4のようにフラグメン

トに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))によりそれぞれ合成した。

【0035】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を決定した後、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図3、4に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニールし、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法(Science, 214, 1205 (1981))によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、ブロック1、2、3とプロ

ック4、5と、ブロック6、7、8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1 μ gとpUC19約1 μ gを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAを構築した(図3)。

【0036】

【実施例2】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現】

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNAを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSA及びプラスミドpT13s(Nco)(J. Biochem., 104, 30 (1988))とから図6に示すように発現プラスミドpSDHSA4を作成した。なお、プラスミドpT13s(Nco)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447(FERM P-10757)から調製した。

【0037】この発現プラスミドpSDHSA4の詳細は以下の通りである。即ち、pHSAをFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片)を調製する。一方、pT13s(Nco)をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片(trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片)を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSA4を構築した。

【0038】このようにして得られたプラスミドpSDHSA4は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

【0039】次にこの発現プラスミドpSDHSA4で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSA4を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH₂PO₄、NH₄Cl、MgSO₄、CaCl₂、ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間インドルアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成していた。

【0040】集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

【0041】図7(A)はHB101、HB101/p

SDHSA4の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1、2、3、Mの略号は以下の通りである。

【0042】1. HB101全菌体蛋白

2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白

3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分

M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSA4の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

【0043】図7(A)と同様の電気泳動後(蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンブロッティングを行なうと図7(B)のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

【0044】顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて(final 0.1M)100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

【0045】以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

【0046】形質転換株HB101/pSDHSA4(AJ12498)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている(FERM P-11208)。

【0047】顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O.Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O.Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

【0048】

【実施例3】

【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用されるpUB110(J. Bacteriol. 134, 318 (1978))と大腸菌のベクターpBR327(Gene 9, 287 (1980))とをEcoRI部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクターpBU4371を構築した。pBU4371は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する(図9)。

13

【0049】枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子 amyE のうち、 α -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約 0.4 kb の領域に存在しており、大腸菌 β -lactamase を枯草菌で分泌するプラスミド pTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が 0.4 kb HindIII 断片として得られる。

【0050】図10は、 α -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点 (Ala33) 付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子のN末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点とN末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成DNAで連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられるDNA配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII部位の直後、Ala30をコードする配列をGCTからGCCに置換することによって唯一のNotI部位が導入できることが判った。

【0051】そこで、図11のような合成DNAをApplied Biosystems社製のDNA合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクター pASEC1 を構築した。pASEC1 は、これをNotIとSmaIで切断し、任意の目的遺伝子の3'末端を平滑化してN末端付近の適当な制限酵素Eで切断しておき、両者を5'末端がNotI cohesiveで3'末端が制限酵素Eに合うような合成DNAで連結することによって、amyEのシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

【0052】HSA分泌プラスミドの構築

まず図13に示すような2本の合成DNAを作製した。この2つの合成DNAと実施例1で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミド pHSA (図3参照) 及びプラスミド pUC19 とから、プラスミド pUC33HSA を構築した (図13)。

【0053】このプラスミド pUC33HSA の構築の詳細を以下に示す。

【0054】即ち、pHSA を FokI と BamHI で切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む 1.8 kb 断片) を調製する。一方、pUC19 を BamHI と HindIII で切断しておく。これらと図13中に示した2本の合成DNAとをT4リガーゼで連結し、目的のプラスミド pUC33HSA を構築した。

【0055】さて次にプラスミド pUC33HSA を制限酵素 BamHI で処理した後にクレノウ処理し、次いでNotIで処理することによって得られた 1.8 kb

14

の断片と、プラスミド pASEC1 を NotI, SmaI で処理して得た 7.5 kb の断片とをT4リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミド pAMY33HSA4 である (図14)。

【0056】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌

当業者ならば容易に入手し得る枯草菌 1A510 株 (J. Bacteriol. 165, 934 (1983)) を上述のプラスミド pAMY33HSA4 でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株 1A510/pAMY33HSA4 を得た。

【0057】このようにして得た形質転換株 1A510/pAMY33HSA4 とコントロールとしてプラスミド pBU4371 を有する形質転換株 1A510/pBU4371 との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で 37℃ で振盪培養した。14, 16, 18 時間で培養液をサンプリングし、培養上清を 1 μ l ずつ 1 回及び 5 回ナイロンメンブランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノプロットングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中において Standards は、SIGMA の Essential globulin free HUMAN Albumin を用いた。Broth の位置には、培地をスポットした。図中の 1, 2, 4, 5 の位置には 1A510/pAMY33HSA4 を、3, 6 の位置には 1A510/pBU4371 をそれぞれスポットした。

【0058】形質転換株 1A510/pAMY33HSA4 (AJ12493) と 1A510/pBU4371 (AJ12492) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSA4 が FERMP-11207 で、1A510/pBU4371 が FERM P-11206 である。

【0059】

【実施例4】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

遺伝子の設計

40 実施例1と同様の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある (FEBS LETTERS 58, 134, (1975), Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982), J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0060】本発明者らは、一般にDNAの配列を求め方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考

えられること、mRNAから逆転写によって作成されるcDNAでは、逆転写の際に塩基の違いが生じ易いこと、報告された年次が新しいことの3つの理由により、ヒト染色体上のアルブミン遺伝子のDNA塩基配列とアミノ酸配列を決定した文献に報告されているアミノ酸配列が最も信頼性が高いと判断し、J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986)に報告されたアミノ酸配列を採用した。

【0061】コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌*10

TTT-Phe 1(.17%)	TCG-Ser 15(2.55%)	TAT-Tyr 0(.00%)	TGT-Cys 0(.00%)
TTG-Phe 2(6.10%)	TCA-Ser 8(1.38%)	TAC-Tyr 18(3.08%)	TGC-Cys 35(5.95%)
TTA-Leu 0(.00%)	TGA-Ser 1(.17%)	TAA-*** 0(.00%)	TGA-*** 0(.00%)
TTG-Leu 0(.00%)	TGG-Ser 0(.00%)	TAG-*** 0(.00%)	TGG-Trp 1(.17%)
CTT-Leu 3(.51%)	CCG-Pro 0(.00%)	CAT-His 0(.00%)	CGT-Arg 3(2.21%)
CTC-Leu 1(.17%)	CCC-Pro 0(.00%)	CAC-His 18(2.72%)	CGC-Arg 10(1.70%)
CTA-Leu 3(.51%)	CCA-Pro 1(.17%)	CAA-Gln 1(.17%)	CGA-Arg 1(.17%)
CTG-Leu 5(9.18%)	CCG-Pro 23(3.91%)	CAG-Gln 18(3.23%)	CGG-Arg 0(.00%)
ATT-Ile 0(.00%)	ACT-Thr 7(1.19%)	AAT-Asn 0(.00%)	AGT-Ser 0(.00%)
ATC-Ile 8(1.35%)	ACC-Thr 21(3.72%)	AAC-Asn 17(2.89%)	AGC-Ser 0(.00%)
ATA-Ile 0(.00%)	ACA-Thr 0(.00%)	AAA-Lys 57(8.89%)	AGA-Arg 0(.00%)
ATG-Met 6(1.02%)	ACG-Thr 0(.00%)	AAG-Lys 2(.34%)	AGG-Arg 0(.00%)
GTT-Val 17(2.88%)	GCT-Ala 22(3.74%)	GAT-Asp 1(.17%)	GGT-Gly 9(1.53%)
GTC-Val 1(.17%)	GCC-Ala 0(.00%)	GAC-Asp 35(5.95%)	GGC-Gly 4(.68%)
GTA-Val 13(2.21%)	GCA-Ala 22(3.74%)	GAA-Glu 58(9.88%)	GGA-Gly 0(.00%)
GTC-Val 10(1.70%)	GCG-Ala 18(3.08%)	GAG-Glu 4(.68%)	GGG-Gly 0(.00%)

【0065】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン(メジャーコドン)と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユースーに片寄りが見られないシステインのコードである(参考文献:細胞工学, 2, 1541 (1983))。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ※

TTT-Phe 21(3.58%)	TCG-Ser 3(.51%)	TAT-Tyr 12(2.05%)	TGT-Cys 15(2.50%)
TTG-Phe 10(1.71%)	TCA-Ser 5(.85%)	TAC-Tyr 8(1.38%)	TGC-Cys 20(3.41%)
TTA-Leu 10(1.71%)	TGA-Ser 6(1.02%)	TAA-*** 1(.17%)	TGA-*** 0(.00%)
TTG-Leu 12(2.05%)	TGG-Ser 2(.34%)	TAG-*** 0(.00%)	TGG-Trp 1(.17%)
CTT-Leu 17(2.88%)	CCG-Pro 10(1.71%)	CAT-His 11(1.88%)	CGT-Arg 2(.34%)
CTC-Leu 6(1.02%)	CCC-Pro 6(1.02%)	CAC-His 5(.85%)	CGC-Arg 1(.17%)
CTA-Leu 4(.68%)	CCA-Pro 7(1.19%)	CAA-Gln 11(1.88%)	CGA-Arg 2(.34%)
CTG-Leu 12(2.05%)	CCG-Pro 11(1.71%)	CAG-Gln 9(1.53%)	CGG-Arg 2(.34%)
ATT-Ile 3(.51%)	ACT-Thr 7(1.19%)	AAT-Asn 11(1.88%)	AGT-Ser 6(1.02%)
ATC-Ile 4(.68%)	ACC-Thr 8(1.35%)	AAC-Asn 8(1.35%)	AGC-Ser 2(.34%)
ATA-Ile 1(.17%)	ACA-Thr 11(1.88%)	AAA-Lys 40(6.83%)	AGA-Arg 13(2.22%)
ATG-Met 5(.85%)	ACG-Thr 2(.34%)	AAG-Lys 19(3.24%)	AGG-Arg 4(.68%)
GTT-Val 12(2.05%)	GCT-Ala 23(4.05%)	GAT-Asp 25(4.27%)	GGT-Gly 21(3.58%)
GTC-Val 7(1.19%)	GCC-Ala 14(2.39%)	GAC-Asp 11(1.88%)	GGC-Gly 4(.68%)
GTA-Val 7(1.19%)	GCA-Ala 17(2.89%)	GAA-Glu 38(6.45%)	GGA-Gly 5(.85%)
GTC-Val 15(2.50%)	GCG-Ala 21(3.58%)	GAG-Glu 24(4.10%)	GGG-Gly 1(.17%)

【0067】さて、図16に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0068】FokIは認識部位の9塩基/13塩基(上側鎖/下側鎖)3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0069】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, Xba

*で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0062】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図16に示した。

【0063】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0064】

【表3】

※た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0066】

【表4】

I, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断点地図を図17に示した。

【0070】DNAの化学合成

設計したDNA配列(図16)を図18のようにフラグメントに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))によりそれぞれ合成した。

【0071】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図17, 18に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニール

し、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法 (Science, 214, 1205 (1981)) によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、ブロック1, 2, 3とブロック4, 5と、ブロック6, 7, 8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1μgとpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAE2を構築した (図17)。

【0072】

【実施例5】[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現 (1)]

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNAを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSAE2及びプラスミドpT13s (Nco) (J. Biochem., 104, 30 (1988)) とから図19に示すように発現プラスミドpSDHSAE12を作成した。なお、プラスミドpT13s (Nco) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447 (FERMP-10757) から調製した。

【0073】この発現プラスミドpSDHSAE12の調製の詳細は以下の通りである。即ち、pHSAE2をFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片) を調製する。一方、pT13s (Nco) をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片 (trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片) を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSAE12を構築した。

【0074】このようにして得られたプラスミドpSDHSAE12は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

【0075】次にこの発現プラスミドpSDHSAE12で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSAE12を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH₂PO₄、NH₄Cl、MgSO₄、CaCl₂、ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でインドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成してい

た。

【0076】集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

【0077】図7 (A) はHB101, HB101/pSDHSAE12の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

【0078】

1. HB101全菌体蛋白
2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分
- M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSAE12の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

【0079】図7 (A) と同様の電気泳動後 (蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンブロッティングを行なうと図7 (B) のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

【0080】顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて (final 0.1M) 100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

【0081】以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

【0082】形質転換株HB101/pSDHSAE12 (AJ12576) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている (FERM P-11804)。

【0083】顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O. Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O. Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

【0084】

【実施例6】

【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用される pUB110 (J. Bacteriol. 134, 318 (1978)) と大腸菌のベクター pBR327 (Gene 9, 287 (1980)) とを EcoRI 部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクター pBU4371 を構築した。pBU4371 は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する (図9)。

【0085】枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子 amyE のうち、 α -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約 0.4 kb の領域に存在しており、大腸菌 β -lactamase を枯草菌で分泌するプラスミド pTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が 0.4 kb HindIII 断片として得られる。

【0086】図10は、 α -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点 (A1a33) 付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子のN末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点とN末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成DNAで連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられるDNA配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII 部位の直後、A1a30 をコードする配列を GCT から GCC に置換することによって唯一の NotI 部位が導入できることが判った。

【0087】そこで、図11のような合成DNAを Applied Biosystems 社製のDNA合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクター pASEC1 を構築した。pASEC1 は、これを NotI と SmaI で切断し、任意の目的遺伝子の3'末端を平滑化してN末端付近の適当な制限酵素Eで切断しておき、両者を5'末端が NotI cohesive で3'末端が制限酵素Eに合うような合成DNAで連結することによって、amyE のシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

【0088】HSA分泌プラスミドの構築

まず図20に示すような2本の合成DNAを作製した。この2つの合成DNAと実施例4で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミド pHSAE2 (図17参照) 及びプラスミド pUC19 とから、プラスミド pUC33HSAE を構築した (図20)。

【0089】このプラスミド pUC33HSAE の構築の詳細を以下に示す。

【0090】即ち、pHSAE2 を FokI と BamHI で切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む 1.8 kb 断片) を調製する。一方、pUC19 を BamHI と HindIII で切断しておく。これらと図20中に示した2本の合成DNAとを T4 リガーゼで連結し、目的のプラスミド pUC33HSAE を構築した。

【0091】さて次にプラスミド pUC33HSAE を制限酵素 BamHI で処理した後にクレノウ処理し、次いで NotI で処理することによって得られた 1.8 kb の断片と、プラスミド pASEC1 を NotI, SmaI で処理して得た 7.5 kb の断片とを T4 リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミド pAMY33HSAE2 である (図21)。

【0092】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌

当業者ならば容易に入手し得る枯草菌 1A510 株 (J. Bacteriol. 165, 934 (1983)) を上述のプラスミド pAMY33HSAE2 でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 を得た。

【0093】このようにして得た形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 とコントロールとしてプラスミド pBU4371 を有する形質転換株 1A510/pBU4371 との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で 37℃ で振盪培養した。14, 16, 18 時間で培養液をサンプリングし、培養上清を 1 μ l ずつ 1 回及び 5 回ナイロンメンブランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノブロッティングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中において Standard s は、SIGMA の Essential globulin free HUMAN Albumin を用いた。Broth の位置には、培地をスポットした。図中の 1, 2, 4, 5 の位置には 1A510/pAMY33HSAE2 を、3, 6 の位置には 1A510/pBU4371 をそれぞれスポットした。

【0094】形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 (AJ12578) と 1A510/pBU4371 (AJ12492) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSAE2 が FERM P-11806 で、1A510/pBU4371 が FERM P-11206 である。

【0095】

【実施例7】[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の腸菌での発現 (2)]

大腸菌でのもう1つの発現プラスミドを図22のようにして構築した。即ち、まず実施例5で構築したプラスミ

21

pSDHASE12のtrpAターミネーターを含む0.3kb BamHI-HincII断片をpHSG299のBamHI-HincIIサイトに連結し、pKT91を構築する。次にpSDHASE12のtrpプロモーターを含む80bp EcoRI-ClaI断片と、ヒト血清アルブミン遺伝子を含む1.8kb ClaI-BamHI断片とをpKT91のEcoRI-BamHIサイトに連結し、目的のプラスミドpKT91HSAE4を得た。

【0096】次にこの発現プラスミドpKT91HSAE4で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pKT91HSAE4を得た。この株を実施例5と同様な培地で培養を行ったところ、やはり菌体内に顆粒が生成した。

【0097】実施例5と同様に顆粒を調製し、同様にヒト血清アルブミンの定量を行ったところ、生成量は80~90mg/L/O.Dであり、実施例5の生成量をさらに4倍以上上回るものであった。

【0098】HB101/pKT91HSAE4(AJ12577)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託さ

22

れている(FERM P-11805)。

【0099】

【発明の効果】原核生物が好んで用いるコドンを多用するようにしてデザインした合成DNAを用いて目的とするヒト血清アルブミンを生産させる本発明は、cDNAを用いてヒト血清アルブミンを微生物に生産させる従来の方法の不完全さを是正し、より効率的な蛋白質生産を行う上で極めて重要なものである。

【0100】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：cleavage-site

存在位置：21..26

特徴を決定した方法：S

配列

【0101】

23

24

配列表 (配列番号1)

10	20	30	40
5' AA GCTTGGGATG GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA			
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys			
50	60	70	80
GAC CTG GGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT			
Asp Leu Gly Gln Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala			
100	110	120	130
CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC			
Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn			
150	160	170	180
GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA			
Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu			
200	210	220	230
AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT			
Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr			
250	260	270	280
GTT GCC ACC CTC CCG GAA ACC TAC CGT GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT			
Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala			
290	300	310	320
AAA CAG GAA CCG GAA CCG AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC GAC			
Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp			
340	350	360	370
AAC CCG AAC CTG CCG CCG CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC			
Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys			
390	400	410	420
ACC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC			
Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Gln Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr			
440	450	460	470
GAA ATC GCA CCG CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC			
Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe			

[0102]

25

26

490 500 510 520
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala

530 540 550 560 570
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp

580 590 600 610 620
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TGC GCT TCT CTC
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu

630 640 650 660
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CGC CTG
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu

670 680 690 700 710
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val

720 730 740 750 760
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GGC GAC CTT CTA
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu

770 780 790 800 810
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT GCG GAC CTG GCG AAA TAC ATC TGC GAA AAC
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn

820 830 840 850 860
 CAG GAC TCC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu

870 880 890 900
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CCG
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro

910 920 930 940 950
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG GCG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0103]

27 28

960 970 980 990 1000
TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu .

1010 1020 1030 1040 1050
TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060 1070 1080 1090 1100
CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA GCG
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110 1120 1130 1140 1150
GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG
Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160 1170 1180 1190 1200
GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC AAA
Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys

1210 1220 1230 1240
CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CCG TAC ACC
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250 1260 1270 1280 1290
AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT
Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300 1310 1320 1330 1340
AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA
Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350 1360 1370 1380 1390
CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG
Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400 1410 1420 1430 1440
TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC
Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0104]

29

30

1450 1460 1470 1480
 TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT TGC TTC TCC GCT CTA GAG
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

 1490 1500 1510 1520 1530
 GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

 1540 1550 1560 1570 1580
 TTC CAC GCG GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

 1590 1600 1610 1620 1630
 AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

 1640 1650 1660 1670 1680
 AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

 1690 1700 1710 1720
 AAA TGC TCC AAA GCT CAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA CAA GCT
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

 1730 1740 1750 1760 1770
 AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GGC CTG TAATGATAGG
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

 1780
 ATCC 3'

【0105】配列番号：2

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：cleavage-site

存在位置：21..26

特徴を決定した方法：S

30 配列

【0106】

31

32

配列表 (配列番号2)

	10	20	30	40
5'	AA GCTTGGGATG	GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA		
		Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys		
	50	60	70	80
	GAC CTG GGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT			
	Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala			
	100	110	120	130
	CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC			
	Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn			
	150	160	170	180
	GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA			
	Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu			
	200	210	220	230
	AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT			
	Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr			
	250	260	270	280
	GTT GCG ACC CTG GCG GAA ACC TAC GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT			
	Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala			
	290	300	310	320
	AAA CAG GAA CCG GAA GCG AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC GAC			
	Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp			
	340	350	360	370
	AAC CCG AAC CTG CCG GCG CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC			
	Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys			
	390	400	410	420
	ACC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC			
	Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr			
	440	450	460	470
	GAA ATC GCA CCG CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC			
	Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe			

【0107】

33

34

490 500 510 520
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala

530 540 550 560 570
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp

580 590 600 610 620
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TGC GCT TCT CTC
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu

630 640 650 660
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CGC CTG
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu

670 680 690 700 710
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val

720 730 740 750 760
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GGC GAC CTT CTA
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu

770 780 790 800 810
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT GCG GAC CTG GCG AAA TAC ATC TGC GAA AAC
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn

820 830 840 850 860
 CAG GAC TGC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu

870 880 890 900
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CCG
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro

910 920 930 940 950
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG GCG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0108]

35 36

960 970 980 990 1000
TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010 1020 1030 1040 1050
TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060 1070 1080 1090 1100
CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA GCG
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110 1120 1130 1140 1150
GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG
Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160 1170 1180 1190 1200
GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC GAA
Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu

1210 1220 1230 1240
CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CCG TAC ACC
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250 1260 1270 1280 1290
AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT
Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300 1310 1320 1330 1340
AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA
Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350 1360 1370 1380 1390
CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG
Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400 1410 1420 1430 1440
TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC
Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0109]

37

1450 1460 1470 1480
TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT CCG TGC TTC TCC GCT CTA GAG
Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

1490 1500 1510 1520 1530
GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT
Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

1540 1550 1560 1570 1580
TTC CAC CGC GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA
Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

1590 1600 1610 1620 1630
AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC
Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

1640 1650 1660 1670 1680
AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA
Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

1690 1700 1710 1720
AAA TGC TGC AAA GCT GAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA GAA GGT
Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

1730 1740 1750 1760 1770
AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GCG CTG TAATCATAGG
Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

1780
ATCC 3'

38

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFokI認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4、5を示す図である。図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSA4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌

trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンブロットング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシーブルーでタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンブロットングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

1. HB101全菌体蛋白
2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分
- M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】α-アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わ

す。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターpASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1μlを1回及び5回ナイロンメンブランにスポットし、抗ヒト血清アルブミン抗体でプロットした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図であ

る。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4, 5を示す図である。図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

【図1】

```

1' AACCTTGGGA TGGACGCTCA CAAATCCGAA GTTCCGACG GTTTTAAAGA CCTGGGTGAG
GAAAACTTCA AAGCGCTGCT TCTGATCGGT TTCCCTCACT ACCTTCAGCA GTGCCCGTTC
GAGGACCCAGG TTAACCTGCT AAACGAAAGTA ACCGAATTCC CTAAACCTCG CTAGCTGAC
GAATCTGCAAG AAAACTGCGA CAAATCCCTG CACACCGTGT TGGGTGACAA ACTGTGCACT
GTTCCGACCG TCCGCGAAAC CTACCGGTGAA ATGCGTCACT CTGCGCTTAA ACAAGAACCG
GAACGCAACG AATGCTTCTT TCAAGCACAA GACGACAAAC CGAACCTGCC GCCTCTGCTT
CGTCCGGAAG TCCACGTAAT GTGACCGGCA TTCCACGACA ACAGCAAAAC GTTCTGTAAA
AAATACCTGT ACCAAATGCG ACCCGCTCAC CCGTACTTCT ACAGACCGGA ACTGCTGTTT
TTCCCTTAAAC GTTACAAACG AGCTTTCACT GAATGCTGCC AGCGCGCTGA CAAACCGGCA
TGCTGTGCTGC CCAAACTGCA CCAACTGCGT GACGAAGGTA AGCGCTCTTC TGCAAAACAG
CGTCTGAAAT GCGCTTCTCT CCACAAATTC GGTGAACGTG CATTCAAAAG GTGGGCACTT
GCGCGCTGTG CCCACGCTTT CCGGAAAGCA CAATTCGCAG AAGTGTCTAA ACTGTTACT
GACCTGACCA AAGTTCAACG CGAATGCTGC CAGCGCGACC TTCTACAGTG CGCAGACGAC
CGTGCAGACC TGCCGAAATA CATCTGCGAA AACCAAGACT CCATCTCTTC TAAACTGAAA
GAATGCTGCG AAAAAAGCGCT GTTGGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAAGAGT AGAAACGAG
GAAATGCGCG CGGATCTGCC GTCTCTGGCG CTGACTTCC TTCAATCAAA AGACGTGTTC
AAAAACTAGC CAGAAAGCAAA AGACGTAATC CTAGGTAATC TCTGTACCA ATACGCTGCT
CGACACCGCG ACTACTCTGT GGTTCGCTG CTGCGCTGCG CAAAAACCTA CGAACTACC
TTCAACCGCG TGGTTGAAGA ACCGCAAGAC CTGATCAAA AGAACTGCGA ACTGTCTAAA
CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAGAACGCT CTGCTGTTT CCAACCAAGT TGGCTCTAAA
CAGCTGTCTA CTCCGACCGT GCTGGAAGTA TCCGCTAAC TGGGTAAAGT TGGCTCTAAA
TGCTGCAAAAC ACCCGGAAAG OAAACGTATG CCGTCCGCGG AAGACTACCT GTCCGTGGTG
CTGAACCGAG TGTGCTTCT GCACGAAAAA ACCCGGCTT CTGACCGTGT AACTAAATGC
TGACCGCAAT CTCTGTTTAA CCGCGCTTCC TCCCTTCTCC CTCTAGAGGT TGACGAAAC
TACGTACCGA AAGAAATTCAA CGCAGAAACC TTCACTTTCC ACCCGGACAT CTGCAACCTG
TCCGAAAAAG AACGCGAGAT CAAAAACAG ACCGCTCTGG TCGAATCTGT AAAACACAAA
CCGAAAGCAA CCAAGCAACA ACTCAAGCG OTGATGGAG ACTTCCGAC TTTCTAGAA
AAATGCTGCA AAGCTGACGA CAAAGAAACC TGCTTCGCTG AAGCAAGCTAA AAAACTGCTA
GCTGCTGTCT AGGCTGCACT CCGCTGTGAA TGATAGGATC 5'

```

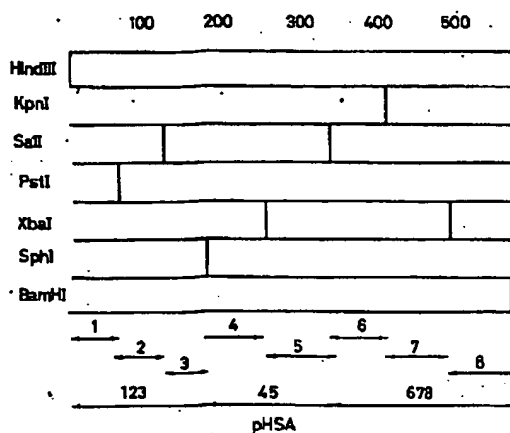
【図2】

ヒト血清アルブミンのN末端

↓

AspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuGlyGlu
 AAGCTTGGGATGGAGCCTCAGAAATCCGAAGTTGGGCACCGTTTTAAAGACCTGGGTGAG
 TTGGAACCCCTACCTGGGAGTGTTTAGGCTTCAACGCGTGGCAAAATTTCTGGACSCACTC
 PstI 起 始 部 位 切 断 部 位

【図3】



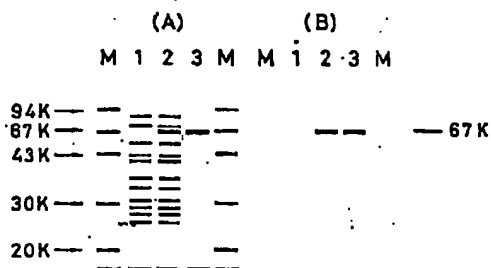
【図11】

NotI SmaI SmaI EcoRI
 5' CGGCGGGCGGGAGCTCCCGGGAATTC
 CGGCGGGCGGCTCGAGGGCCCTTAAGAGCT
 HpaII cohesive SmaI cohesive

【図5】

SD Met Asp Ala His
 5' CGATTAGTAAGGAGGTTTAAATGGACGCTCAC
 TAATCATTCTCCAAATTTTACCTGCGAGTGTTTA
 ClaI cohesive FokI cohesive

【図7】



ブロッコリ

プロジェクト4

SpbI
CTCTGCTCCCAAACTGGCAAGAACTGCTTACGAAGTAAGCGCTCTCTCCAAAA
GTACGGAGCGAGCGCTTTGACCTGCTTACGCACTGCTTCCATTCGGCAGAGAGCTTTTTCGCA
CAGCGTCTGAATAAGCGCTTCTCTCAGAAAAATCGCTAACGCTGATTCACAAAC
ACTTTACCGCAGAGAGAGCTTTTAAAGCACTTGACATAGCTTTCCGACCGCTC
GTGGCACTGCGCGCTGCTTCCAGCGCTTCCGCAACGCAATGCTTCCAGAAAT
AAACGCGCCACAGCGCTGCGCAAGCGCTTTGCTTAAAGCGCTTCTACAGATTTC
GTCTAAAGCTCTACTGACTGCAACGAGTTTACACAGCAATGCTGCCACGCGAGCTT
ACCAATACGATGCACTGGTTTCAAGTGTGGCTACGACGCTGGCTGCTGCTGCAAGATC

XbaI

プロダクト

Pair 1
GAAACTCGGACAAATCCTGTCACACCTGTTGGTGACAACTGTGACAGTTGCGACCTCGGC
ACCTTTTTCACCTGTTTATGGAACGTGTGCGACAGGCACTGTTTGACAGTGCAGACCT

GAAACCTACGGTGAATGGCTGAGTGTGGCTAAACAGGAACGGAAAGCAACGAATGCTTCT
CGAACCGCTTTGGATGCCACTTTACCGACTGACCAAGGATTTGTGCTTGGCTTGGCTTGCCT

TCAGCAAAAGACGACAACCGAACTGCCCGCCCTGCTTCGTECGGAAG S&I
ACCAAGGAAGTCTGTCTTCTGCTTGGCTTGGACGCGCGGACCAAGCAGGCTTCAGT

プロジェクト

XhoI
CTAGAGTGGGAGACGACCGTGGCAGCTGGGAAATACATCTGCGAAACACGACTCCAT
TCAAGCGTCTCGTGGCAGCGCTGCACCGCTTTATGTAGACGCTTTTGGTCGTGAGGTAGAGAGAT

CTCTTCTAACTGAAGAAATGCTGCGAAAACCGCTGTGGAAAATCTCACTGCATCGCAGAA
TTGACTTCTTACGACCGCTTTTGGCGACGACCTTTTACAGCTACCTACCGCTTTCATCTTTT

GTAGAAACGACGAAATGCCGCGGATCTGCCGTCTCTGGCGCTGACTTCGTTGAATCAAAGAG
GCTGCTTACGGCGGCTAGACGGCAGAGACGGCGACTCAAGCAACTTAGTTTCTGCACAGTT

GTGTCAAAAAGTACGCAGAACAAAAGACGTATTCTAGGTATGTTCTCTACGAATACGCTCG SalI
TTTGATCCCTCTTCGTTTCTCCATAGGATCCATACAGGCATGCTTATCCGACAGCT

プロダク

SalI
TCGACCTAATGTGCACCGCATTTCCACGACAACGAAGAAACCTTCTGTAAAAAATAC
GCATTACAGCTGCCCTAAGGTCTCTTCTTCTTTTGGAGGACTTTTTATGGCATCT

CTGTACGAATCCACCGCGTCACCGTACTTETACGCACCGGAATGCTGTTCTTGG-
TTAGCGTGGCACTGGCATGAAGATCGTGGCTTGACGACAGAGCAATTGCA

CTAAAGTTACAAAGCAGCTTTCAGTGAATGCTGCGAGGCGGCTEACAAAGCGGCATG
ATGTTTCTGCAAGCTGACTTACGAGGTCGCGGAGCTGTTTGGC SpH

4B

·圖 4A

70-21

[illegible]

70771

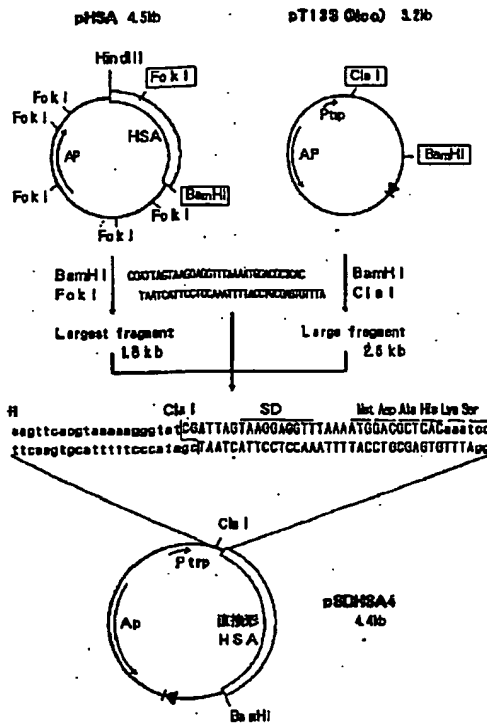
[illegible]

70421

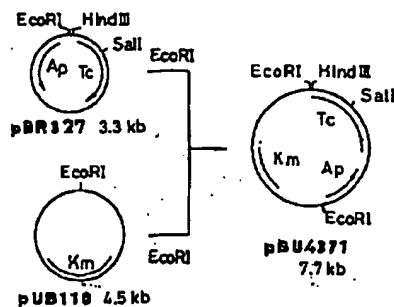
[illegible]

4c

【図6】



【図9】

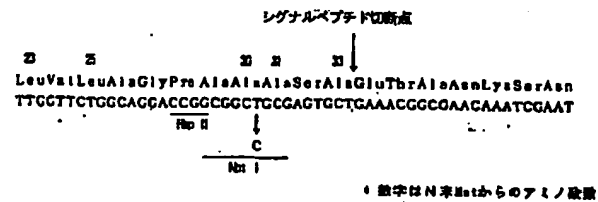


【図8】

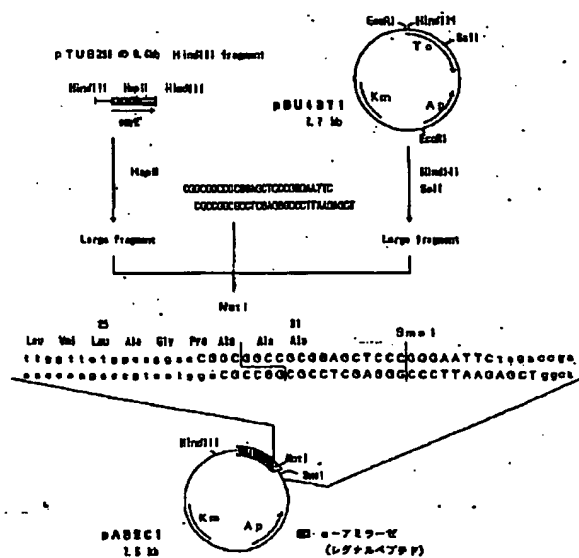
Observed : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-
 Predicted : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-

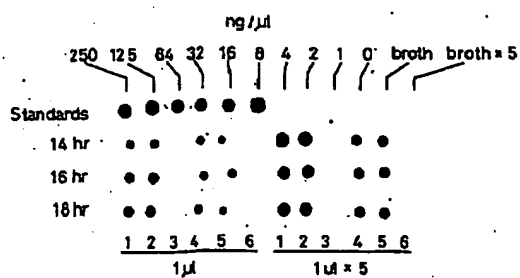
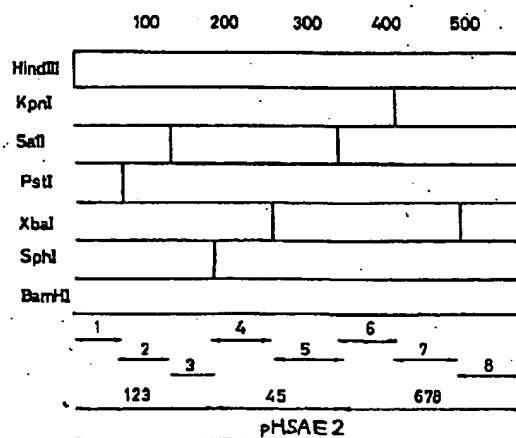
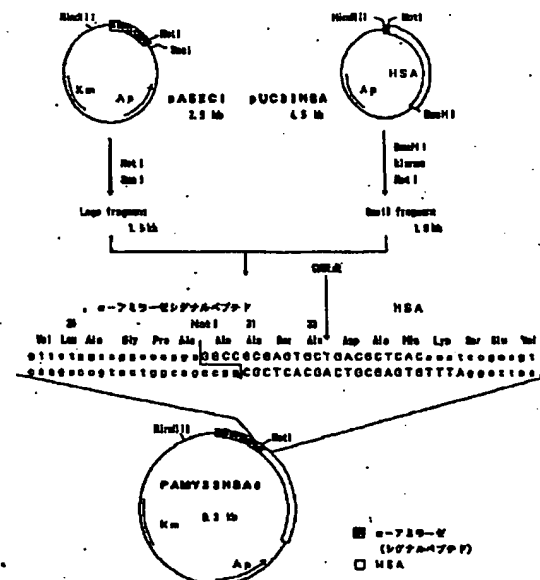
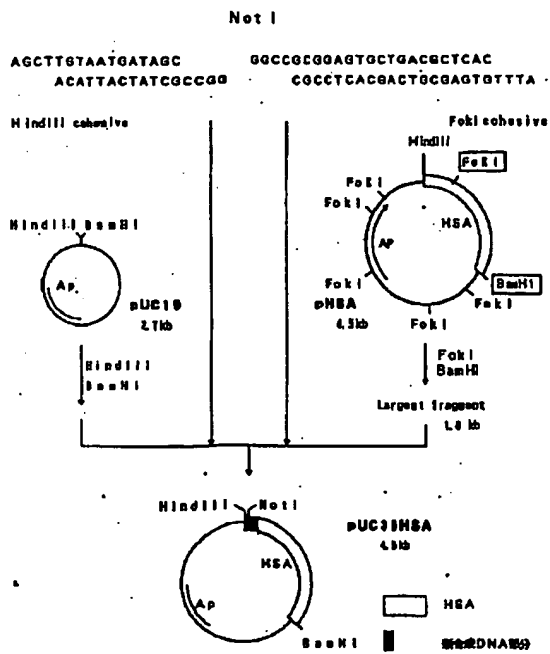
Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly
 Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly

【図10】



【図12】

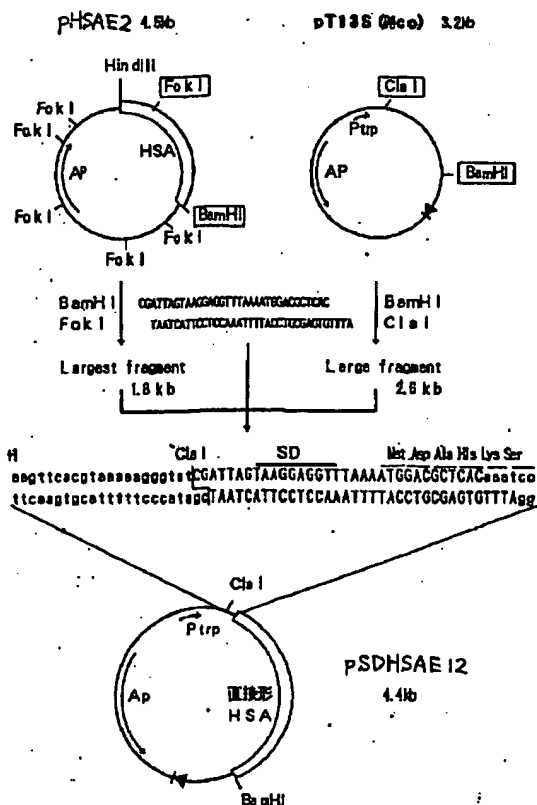




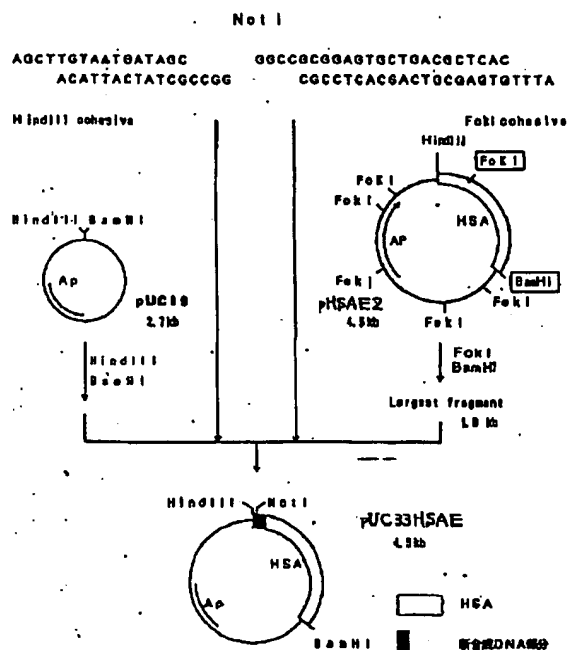
【図16】

3' AACCTTGGGA TGGACCGTCA CAAATCCGAA GTTCCGACG GTTCTAAAGA CCTCGGTGAG
 GAAACTTCA AAGCGCTGGT TGTGATCGGT TTCCGTCAGT ACCCTTACGA GTGCCCGTTC
 GAGGACCAAG TTAAACTGGT AAACGAAAGTA ACCGAATTCG CTAAACCTC GGTACCTGAC
 GAATCTGAG AAAACTGCGA CAAATGCGTG CACACCGTGT TCGGTGACAA ACTGTGCACT
 GTTGGGACCG TGGCGGAAAC CTACCGTCAA ATCGCTGACT GCTGGCTTAA ACAGGAAACCG
 CAACGGCAAG AATGCTTCTT TCAGCACAAA GACGACAAAC CGAACCTGCC CGGCTGTGT
 CGTCCGCAAG TCGACCTAAT GTGACCGCA TTCCAGCACA ACCAAGAAAC GTTCTCTAAA
 AAATACCTGT ACCAAATCGC ACGCGCTCAC CGTACTTCT ACACACCGCA ACTGCTGTTT
 TTCCCTAAAC GTTACAAAGC AGCTTTCCT CAATGCTGCC AGCGGCTGA CAAAGCGGCA
 TGCCCTGCTG CCAAACTCGA CGAACTGCTT GACCAAGCTA AGCGCTCTT TCGAAACAG
 CGCTGAAAAT GCCTTCTCTT CCAGAAATTC GCTGAACCTG CATTCAAAGC GTGGGACGTT
 CGCGCGCTGT CCGAGCGCTT CCGAAAGCA GAATTCGAC AAATGCTCAA ACTGGTTACT
 GACCTGACCA AAGTTACAC CGAATGCTGC CACCGCGACC TTCTAGAGT CCGACACGAC
 CGTGGGACG TGGCGAAATA CATCTGCGAA AACGAGGACT CCACTCTCTT TAAACTGAAA
 GAACTGCTGG AAAAAGCGCT GCTGCAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAAGT AGAAAACGAC
 GAAATCGCG CGATCTGCC GTCTCTGCC GGTGACTTCC TTGAATCAA AGACGCTGCT
 AAAACTTAC CAGAAAGCAA AGACGTATTC CTAGGTATGT TCTGTACGA ATACGCTGCT
 CGACACCGCG ACTACTCTGT GGTCTGCTG GTCCGCTGG CAAAAACCTA CCAAACTACC
 CTGGAAGAAAT GCTGCGGAC GGTGACCCA CACGAATGCT ACAGAAAGT GTTGGACGAA
 TTCAAACCG TGGTTGAGCA ACCGACAGAC CTGATCAAA AGAACTGCCA ACTGTTGAAA
 CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAGAACGCT CTGCTGGTTC GTACACGAA AAGGCTACCG
 CAGCTGCTTA CTCCGACGCT GGTGGAATTA TCCGCTAAC TGGCTAAAGT TGGCTCTAAA
 TGTGCAAA ACCTGGGAGG CAAACGTATG CGCTGCGCG AAAGACTACT GTCCGCTGGT
 CTGAACGAGG TGTGCTGCT CCACGAAAA ACCCGGCTTT CTGACGCTGT AACTAAATGC
 TGACCGAAT CTCTGCTTAA CCGCGCTGCT TGTCTGCTG CTCTAGAGGT TGACGAAACG
 TACGTACCGA AAGAAATCAA CCGCAAAAC TTCACTTTC ACCCGGACAT CTGCAACCTG
 TCCGAAAAAG AACGCCAGT CAAAAACAG ACCGCTCTG TGAACCTGCT AAAACACAAA
 CCGAAACCA CCAAGAACCA ACTGAAACCG GTGATGGAG ACTTCCGAG TTTCTAGAA
 AAATGCTGCA AAGCTGACG CAAAGAACG TGTCTGCTG AAGAAAGCTA AAAACTGATA
 GCTGCTGCTC AAGCTGACT GGGCTGTAA TGTAGGATC C 3'

【図19】



【図20】



・ブロック1

IN48
 AGCTTCGATCGACGCTCACAAATCCGAAGTTGGGCAACGCTTTAAAGCACTGGGTGAGAA
 ACCCTACCTCGCAAGTTTACGCTTCAACGGCTGCGAAATTTCTGGAGCACTGCTTTTGAAGTT

 AACTTCAAGCGCTGCTTCGATCGCTTTCGCTCAGTACCTTCGAGCTGCCGCTCGAGGA
 TCCCGCAAGCAATACGGAAGCGAGTATGGAAGTCTGCTCAGCGGCAAGCTCTCGTCCAA

 CCACGCTTAACTGTAAGCAAGTAAACGGAATTCCTTAAACCTGGCTAGCTGAGCAATCTGA
 TCGACATTTGCTTCAATGGCTTAAAGCAATTTGCGAGGCACTGACTCTTAS
Page

プロ・ク4

SpHx
CTCTGTCGGCAACCTGGCAAGCACTGCTGACGAAGCTAACGGCTCTTCTCGAAAA
GTACGGGACACGGTTTGACTCTGTTGAGCACTGCTTCTGATTCGGCAAGACGTTTGTGCGAG
CAGGCTCTGAATTCGGCTTCTCTCGAAAAATTCGGCTGAACGTCGATTCAGAGC
ACTTTAGCGCAAGACAGGCTCTTAAAGGCACTTGGCACTGAGTTTGGCAGCGGTC
GTGGGCACTGCGCGCTTGTCTCGAGCGCTTCTCGAAGCAAGATTCGACAGAAAT
AACGCGCGGCAAGGCTGCGCAAGCGCTTCTGGCTTAAAGCGCTTCTCAAGATTG
GTCTAACTGCTTACTGACTCTGAAGGTTTCAAGCTTACAGCAATTCGCGCAAGCGCACTT
ACCAATGCTGCTGATCGGCTTTCAAGTGTGCTTACGCGAGTTCGCGCTGCGCGAAGATC The XbaI

79-92

[illegible]

プロジェクト

Seq
 CTAGACTGGCAGACGACCTGTGGGACCTGGGCAAAATACATCTGGCAAAACAGGACTCCAT
 TCAACGCTGTGTGGCAGGCTGTGACCGCTTTATGCTAGACGCTTTTGGTCTGTGAGCTAGAGACAT

[illegible]

プロジェクト

8411
 TCGACCTAATCTGCAACCCGATCCACGCAACGAGAAACCTCTCTGA AAAAATAC
 GCATTACACCTGGCGTAAGCTGCTGTTCTGTTTTCGAAAGCACTTTTTCATGCATCTCT
 CTGTACGAAATCGCAGCCGCTGACCCGTACTTCTACGCAACGGGAAGCTGCTCTCTTCG-
 TTAGCTGCGCAGCTGCGCATGCAAGATGGGTGCGCTTCGACGCAACGCAAGCAATTTCGA
 CTAAGCGTTACAAAGCGCTTCTCACTGAATGATCTCCAGCGCTGCTACAAAGCGGCGATG
 ATGTTTCTGCTGCAAGCTTCTGACGAGCTGCGCGGCTGTTTCTTCGC Sub I

圖 18 B

☒ IRA

700:81
TALL
CTGGCAAAA
TTCAAAACC
CAGCTGGT
GACCTTTT
AACTTTGG
GGTAC
TGGC

70-97

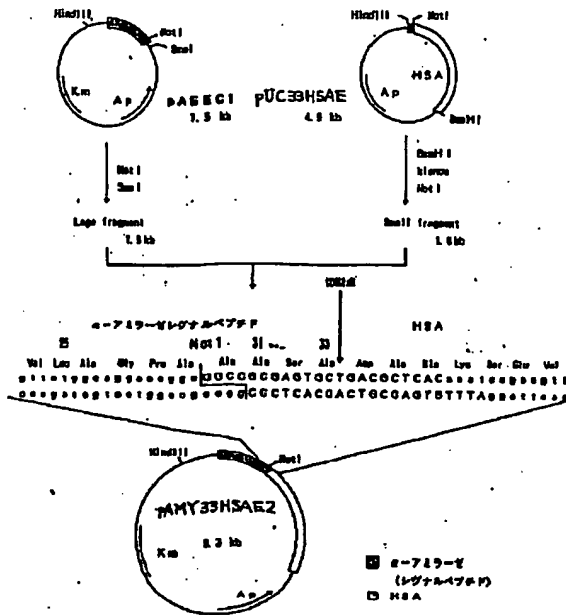
[illegible]

70778

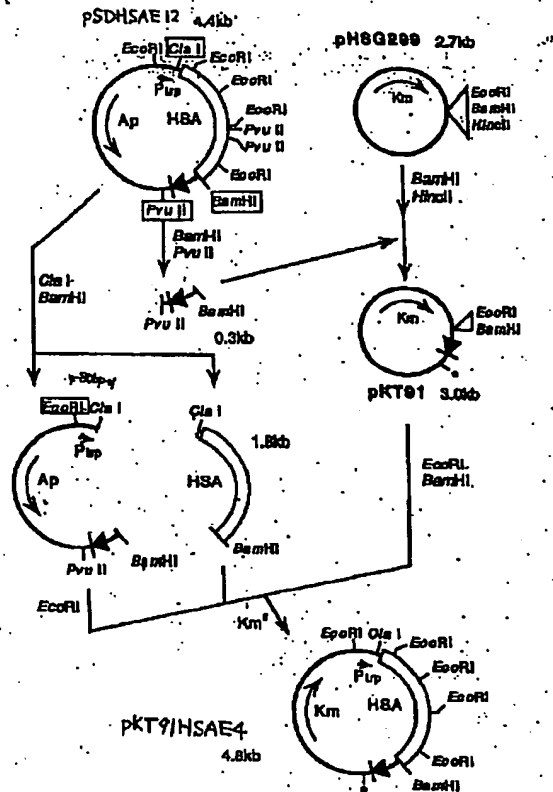
[illegible]

186

【図21】



【図22】



【手続補正書】

【提出日】平成3年8月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFokI認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4A】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロッ

ク1を示す図である。

【図4B】図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック2を示す図である。

【図4C】図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック3を示す図である。

【図4D】図4Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4を示す図である。

【図4E】図4Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック5を示す図である。

【図4F】図4Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6を示す図である。

【図4G】図4Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック7を示す図である。

【図4H】図4Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSA4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンブロットング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシーブルーでタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンブロットングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。1. HB101全菌体蛋白2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】 α -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わす。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターPASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1 μ lを1回及び5回ナイロンメンブランにスポットし抗ヒト血清アルブミン抗体でブロットングした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY3

3HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18A】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1を示す図である。

【図18B】図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック2を示す図である。

【図18C】図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック3を示す図である。

【図18D】図18Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4を示す図である。

【図18E】図18Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック5を示す図である。

【図18F】図18Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6を示す図である。

【図18G】図18Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック7を示す図である。

【図18H】図18Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

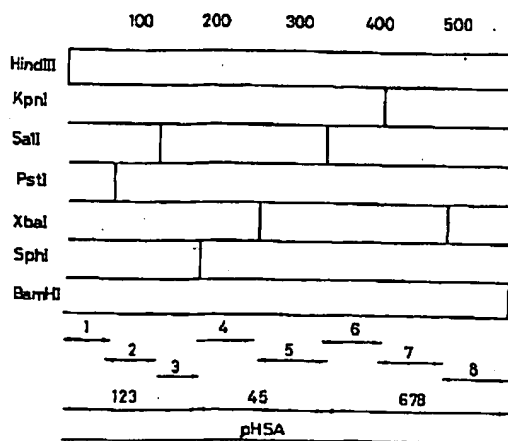
【補正内容】

1	AAGCTTGGGA	TGGACGCTCA	CAAAATCGGA	GTTGCGCACC	DTTTTAAAGA	CCTGGGTGAG
	GAAGAAATCTA	AAGCGCTGGT	TCTGATCGGT	TTCGGTCAAT	ACCTTACAGA	TCTGGCGGTG
	CAGCAGCACA	TTAAACCTGG	AAACGAAGTT	ACCGAATTGG	CTAAAGACCTG	GTATCGTGCAC
	GAATCTGAGC	AAAACTCGCA	CAAAATCGCTG	CACACCGCTG	TCCGCTGACAA	ACTGTCCGACT
	CTTGGCAGAC	TCCGCGAACC	TACGCGTAA	ATCGGTCAGT	CTGTGCGTAA	ACAQGAACCG
	GAACGCCAAC	AAATCTCTCT	TCAGACCAAA	GAGCACAATC	CGAACCTGCC	CGCGCTCGTT
	CGTCGCGAAG	TGCGACGAAT	TTGCAACCGA	TGACACGACA	AGAAAGAAAG	CTTCTGTAAAG
	AAATACCTCT	ACGAAATCGC	ACCGCGTCA	CGGTACTTGT	ACGCAACCGA	ACTCGCTCTT
	TTCGCTAAAC	GTATCAAGAG	AGCTTTCAT	GAATCTGCCC	ACGGCGCTGA	CAAGCGCGCA
	TGCTCTGCTG	CGAACTTGGC	CGAACTGGGT	CAGCAAGCTA	ACGGCTCTTC	TGCCAAACAG
	CGCTCTAAAT	CGCCTTCTCT	CCAGAAATTC	GTGGAACGTG	CATTCTAAAG	TGTGGGCAGT
	CGTCGCTGT	CCGACGCGTT	CCGGAAGACA	GAATTCCGAC	ACTGTCTAAG	ACTCGTTACT
	CAGCTGACGA	AAGTCTCACAC	CAAAATCGCTG	CACGCGGACC	TCTTAGAGTG	CGCGACAGAC
	CGTCGCGACC	TGCGGCAATA	CTCTGCGTAA	AACCGAGAGT	CCATCTCTTC	TAAACTGAAA
	GAATCTCTCG	AAAAACCGGT	CTCTGGAATA	TCTCATGCA	TGCGAAGAGT	AGAAACGAGC
	GAATATGCGG	CGGATCTGCG	CTCTCTGCG	CTGACTCTG	TCCGATCAAA	AGACGCTGAC
	AAAAAATTAC	CAGAAAGCAA	AGACGATATC	CTAGGTATGT	TCTGTGTAAC	ATACGCTCGT
	CGACACACCG	ACTACTCTGT	GGTTCTTGCT	CTCGCGCTGG	CAAAAACCTA	CGAAATCTAC
	CTGCAAAAAA	CTGTGCGAGC	GGGTACCCCA	ACGAATGCT	ACGCAAAAGT	GTTGCAAGAT
	TGCAAAACCG	TGTTTGAACA	ACGAGCAGAT	CTGATTAACC	AGAACCTGGA	ACTGTTCAAA
	CAGCTGGGTG	AATACAAATT	CCGGAAGCGT	CTGCTGGTTG	GGTACACCAA	ATAGCTTACG
	CAGCTGTCTA	CTGCGCAAGT	CGTGGAACTA	TCCGCTTAAC	TGGGTAAAGT	TGGCTCTAAA
	TGCTTCAAAC	ACCGCGAAGC	GAACGATAG	CTGCGCGGG	AAAGTACCT	TGCGCTGTGT
	CTGACACGAG	TGTGCTTCT	CGACGAAAA	ACCGCGGTTT	CTGACGGGT	AACTAAATGC
	TGACCGGAAT	TCTGTGTTAA	CGCGCGTCC	TGCTTCTGCG	CTCTAGAAGT	TGACGAAATC
	TAGCTACCCA	AAQAATTCAA	CGCAGATACC	TTCAATTTTC	ACCGGACAGT	GTGCAACCTG
	TGCGAAAAAG	AAGCGCGAAT	CAAAAACAC	ACCGCTGTGG	TGGAAGTGGT	AAAGACAAAA
	CCGAAACGAA	CAAAAGACAA	ACTGAAAGCG	GTGATGGAGC	ACTTCGACAT	TTTCTAGAAA
	AAATGCTGCA	AGGCTGACCA	CAAAAGAAAC	TGCTTCTGCT	GAAGAGCGAA	AAAACTCGTA
	CTGACGCTTC	ACGCTGCACT	GGGCGTGTAA	TGATACGATC	C 3'	

ヒト血清アルブミンのN末端

AspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuGlyGlu
AAGCTTGGGATGGACGCTCACAAATCCGAAGTTGCGCACCGTTTTAAAGACCTGGGTGAG
TTCCAGACCTACTCGCAGTGTTTAGGCTTCAACGCGTGGCAAAATTTCTGGACCCACTC
FokI 启动子 切割 位点

【図4A】



ブロック1

Bind II
 ACGTTCGGGATCGACCTTACAAATCCGAAGTTCGGCACGCTTTTAAAGACCTGGCTGAGGAA
 ACCCTACTACCTCGAGGCTTTAGGCTTCAACGGCTGGCAAAATTTCTGACCTCACTCCTTTGAAGTT
 AACTTCAAGCGCTGCTTCGATGCTTTTCGCTAGTACCTTCAGCAGTCCGGCTCTCGAGGA
 TCCGGACCAAGATAGCAAAAGGACCTAGTACCGAAGTCTCTAAGCGCAAGCTCTCTGTCGAA
 CCAGCTTAAATCTTAAACCAAGTACCGAATGCTCTGAAACCTGGGTAGCTGACGAACTCTGCA
 TTGACATATTCGCTTATTCGCTTACCGCTTACCGATTTGGACGACCTGACCTTGAAG
 Page 10

【例 4 B】

70722

PSIX
GAAAGCTGGGACAATCCCTGGACACCTGTTGGGTGACAAAGCTGTGGACTGTTGGGACCCCTGGCG
ACGCTCTTTGAGCGTGTTTACGCACTGTGGGACAAGCCACTGTTTGACACGTTACAAAGCT

GAAAGCTACGGTGAATGGCTGAAGTGTGGCTAAACAGGAACCGGAAAGCAAGAACTGTTCTCT
GGGACCGCTTTGGATGCAAGTTACCGCACTGACGAGCGAATTTGCTCTGGCCTTGGCTTGCT

TCGACAGCGGACGACAACCGCAACCTGGCGCGCGCTGTTCTGGCTGGGAG SalX
ACGAGGAAGCTGTTGTTCTGCTTTGGGCTGGAGCGCGGACGACGAGGCTTACAGT

【☒4D】

プロット4

SphI
CTCTGCTCCGGAATCGACGAATCTGCTGACGAAGGTAAAGCGTCTTCTGCAAAA
GTACCGACGACGGCTTTGACCTGCTTGACGCACTGCTTCATTCCGACAGAACGCTTTTGCCGAC
CAGCGTCTGAATTCGGCTTCTCTCCGAATATCGGTGAACGTCGATTCAAGC
ACTTTACCGGACGACGAGTGCTTTAAGCAATCTGCACTGAATCTTGGACCCGTC
GTGGGCACTGCGCGCTCTCCACGCTTCTCCCAAGCAAGTAATCCGACAGT
AAGCGCGGACAGGGTGCGCAGGGCTTTCGCTTAAGCGTCTTCACAGATTG
GTCTAAATCTTACTGACCTCAAGGATCTACACCGAATCGCCACGGCGACCT
ACCAATGACTGGACTGTCTCAAGTGTGCTTACGAGGTCGGCGTGGCAAGATC
XbaI

70725

3baK
CTAGAGTGGCGACGACCGTGGCGACTGGCGAAATACATCTGGCGAAACGACGACTCCAT
TCAAGCGCTTGCTGGCGACGGCTGACCGCTTATGTAGACGTTTGTGGTCTGAGGTAGAGAGAT

CTCTTCTAAATCGAAGAATCTGCGAATAAACCGCTGCTCGCGAATAATCTCAATCGATCCGAGA
TTGACTCTTTTACAGCACTTCTGCTGGCGACGACTCTTTAGAGTCTGACGATGGCTTTCACTCTTT

GTAGAAAACGACGAATATCCGCGCGATATCTGGCTTCTGGCGCGTCACTTGTTGATATCAAGAGAC
GCTGCTTTAGCGCGCGCTAGACCGCAGACACCGCCCACTCAAGCAGACTACTTTTCTCGACGCTT

GTGTGCAAAATCACTGACAGACGAAGAAGACGATATCTCAAGTATTTCTCTGTACCAATACGGCTCG
TTTGATCGCTTCTGTTTCTCTCTCAAGAAGCTCATACAGACGACATCTTATCGACGACGT

70,96

[illegible]

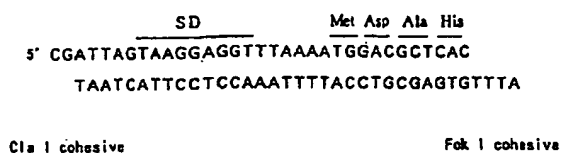
70,31

[illegible]

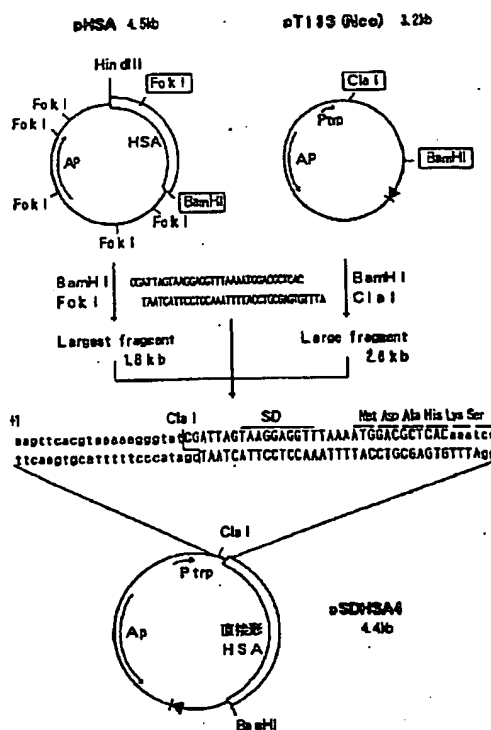
70,91

[illegible]

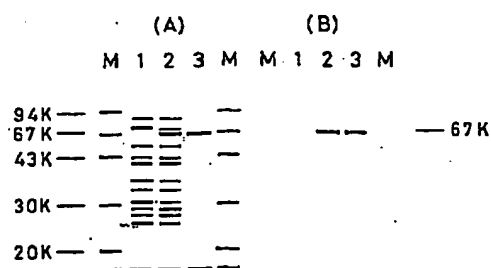
【図5】



【図6】



【図7】

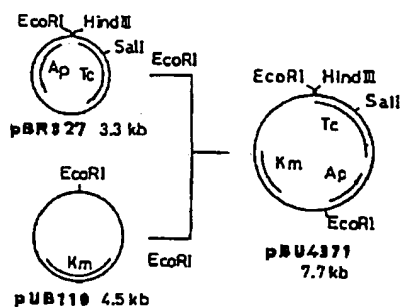


【図8】

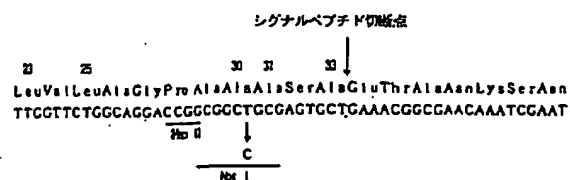
Observed : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-
 Predicted : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-

Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly
 Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly

【図9】

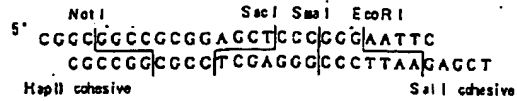


【図10】

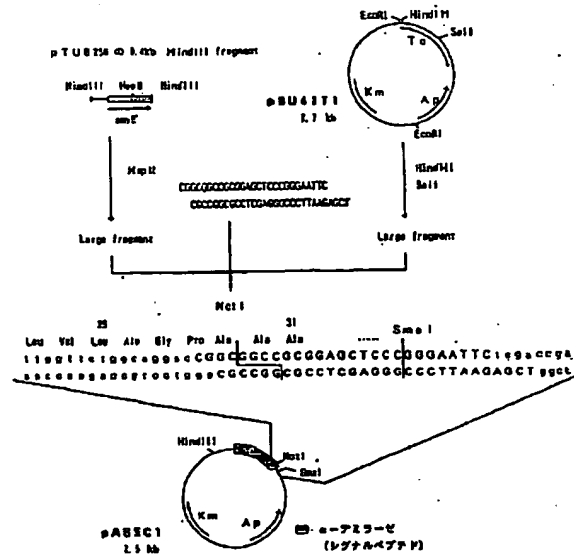


※ 数字はNからMetからのアミノ酸数

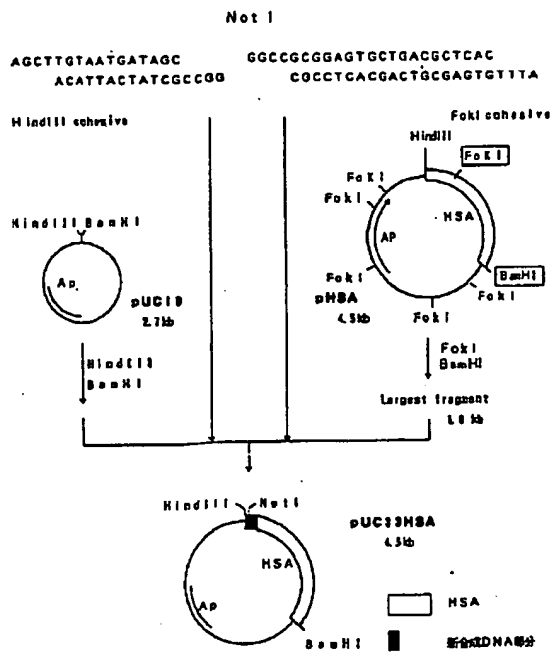
【図11】



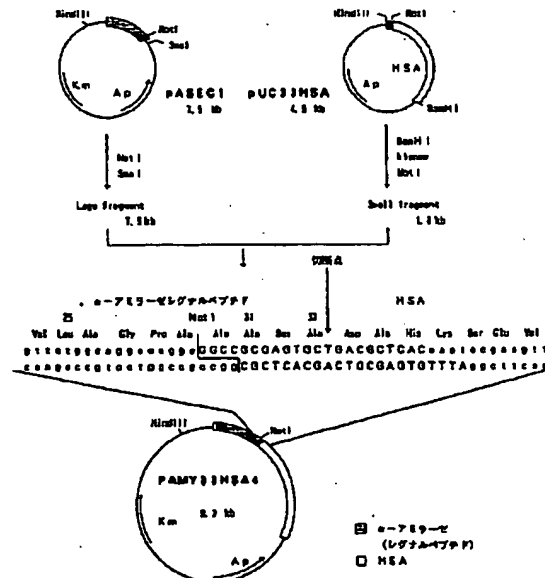
【図12】



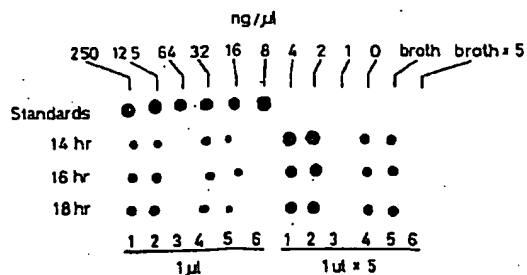
【図13】



【図14】



【図15】



【図18A】

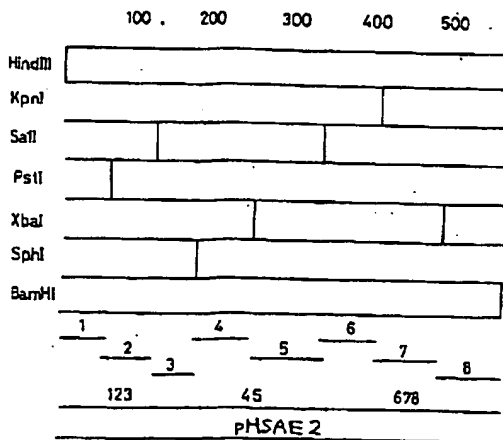
プロット1

HindIII
 AGCTTGGGATGAGCGCTCACAATCGAACTTGGCAGCGTTTAAAGACCTGGCTACGAA
 ACCTTACCTGGAGTGTGTTAGGCTTCAACCGCTGGCAAAATTTCTGGACCACTGCTTTTGAAT
 AACTTCAAAGCGCTGTTCTGATCGTTTGGCTCAGTACCTTCAGCACTGCGCTTCGAGGA
 TCGCAACCAAGACTAGCGAAAGCGATGATGGAAGCTGCTACGGCAAGCTGCTGCTGCAAT
 CCAGCTTAACTGCTAAACCAACTAACCAATTCGCTAAACCTGCTAGCTACCAATCTGA
 TTGACCAATTCCTTCATTCGCTTAAGCAATTTTGACCGATGCACTGCTAG PstI

【図16】

5' AAGCTTGGGA TGCAGCGTCA CAAATCGGAA GTTGGGCAAG GTTTTAAAGA CTTGGGCTGAG
 GAAAACTTCA AAGCGCTGCT TCTGATCGCT TTGCTCTCACT ACCTTCAGCA GTGCCCGTTG
 GAGGACCAAG TTAAGCTGGT AAAACGAGTA ACCGAAATTC CTAAAGCTG GCTAGCTGAC
 GAATCTGAG AAAACTGCGA CAAATCGCTG CACACCTCTG TCGGTGACAA ACTGTGCACT
 GTTGGGACCC TGGCGGAAAC GTACGGTGAA ATGGCTGACT GCTGCGCTAA ACAGGAACCC
 GAACGCAAGC AATGCTTCTT TCAGCACAAA GACGACAACC CGAACCTGGC GCGCTGCTT
 CGTGGCGAAG TCGACGTAAT GTGCACCGCA TTCCACGACA ACAGCAAAAC CTTCCTGAAA
 AAATAGCTGT ACGAAATGCG ACCCGCTGAC CCGTACTTCT ACAGACCGGA ACTGCTGTTT
 TTGCTTAAAC GTTACAAAGC AGCTTTCATG GAATGCTGCC AGCGCGCTGA CAAAGCGGCA
 TGGCTGCTTC CGAAACTGGA CGAACTGCTG GACCAAGGTA AGCGCTGTTT TGCAAAACAG
 CGTCTGAAAT GCGCTTCTCT CCAGAAATTC GCTGAAGCTG CATTCAAAGC GTGGGCAAGT
 GCGCGCTCTG CCGAGCGCTT CCGGAAAGCA CAATTCGCGA AAGTGTCTAA ACTGGTTACT
 GACCTGACCA AACTTCACAC CGAATGCTGC CACGCGGACC TTCTAGAGTG CCGAGACGAC
 CGTGGCGACC TGGCGGAAAT CATCTGCGAA AACCAAGACT GCATCTCTT TAAACTGAAA
 GAAATGCTGG AAAAAAGCGT GCTGGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAGT AGAAAAAGAC
 GAAATGCGCG CGCATCTGCC GTCTCTGCGG GCTGACTTGG TTGAATCAAA AGAGCTGTCT
 AAAAAAGTCA CAGAAAGCAA AGACGTAATC CTAGGTATGT TCTGTACGGA ATACGCTGCT
 CCACACCGCG ACTAGCTGTG GGTCTCTCTG CTGCGCTTGG CAAAAACCTA CCAAACTAGC
 CTGGAAGAAAT TGTGCGGAGC GGTGACCGCA CACGAATGCT AGCGAAAAAG GTTCCACGAA
 TTCAAAACCGC TGGTTTCAAG ACAGCAAGCT CTGATCAAA AGAACTCCGA ACTGTTCCGA
 CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAGAACGCT CTGCTGCTTC GTACACCAAA AAGGTAACG
 CAGGTGTCTA CTGCGGACCT CGTGGAACTA TCCGTAAGC TGGGTAAAGT TGGCTCTAAA
 TGCTGCAAAAC ACCCGGAAGC GAAACGTATG CCGTGGCGCG AAGACTACT GTCCGTGGTG
 CTGAACGAGC TGTGCTTCT GTACGAAAAA ACCCGCTTT CTGACGCTGT AACTAAATGC
 TGCACCGAAT CTCTGCTTAA CCGCGGTCTG TGCTTCTCG CTCTAGAGGT TCACGAAAC
 TACCTACGGA AAGAAATTCAA CCGAGAAAC TTCACTTTCG ACCCGACAT CTGACCCGTG
 TCGAAAAAG AAGCGCAGAT CAAAAACAG ACCGCTCTGG TGAAGCTGT AAAACACAAA
 CCGAAAGCAA CCAAGGACA ACTGAAAGCG GTGATGAGC ACTTCGAGC TTCTGTAGAA
 AAATGCTGCA AAGCTGACGA CAAAGAAAC TGCTTCTCTG AAGCAAGCTAA AAAACTGGTA
 GCTGCTCTC AGCTGCACT GGGCTGTAA TGATAGGAT C 3'

【図17】



【図18B】

プロット2

PstI
 GAAAGCTGACAAATCGCTGCAACGCTGTTGGTGAACAACTGTGCACTGTTTGGACCTGCG
 AGCTCTTTGAGCTGTTTGGGACGCTGCGGACAGGCACTGTTTGCACGCTGACAAAGCT
 GAACTACGCTGAAATGGCTGACTGCTGCGCTAAGACGAAACCGGAAAGCAAGCAATGCTCT
 GCGACCGCTTTGATGCACTTTACGAGTACGAGCGGATTTGCTGCTTGGCTTGGCTT
 TGAACAAAGACGCAACCGCAACCTGCGCGGCTGGTTCGTCGGAAG SalI
 ACGAAGCAAGCTGTTTCTGCTTGGCTTGGACGCGCGGCAAGGAGGCTTCACT

【図18C】

ブロック3

SalI

TCGACGTAATGTGACCGCATTCACGACAAAGAAACCTTCGTGAAAAATAC
 CCATTACAGCTGGCGTAAGCTGCTGTTGCTTTCGGAAGGACTTTTATGACATGCT
 CTGTACGAAATCGACGCGCTCAGCGCTACTTACGACCGGAAGCTGCTGTTCTCG
 TTAGCGTGGCGAGTGGCGATGAAGATGCGTGGCTTCAGCACAAGACGATTGCA
 CTAACGTTACAAAGCAGCTTTCACTGAATGCTGCCAGCGGCTGACAAGCGCGATC
 ATGTTTCTGCGAAGTGACTTACGACGCTCGCGGACTGTTTGGC SpH

【図18D】

ブロック4

SpH

CCTGCTGCCGAACTGGACAACTGCTGACGAGGTAGGCGCTTTCTGCAAAA
 GTACGGACGACGGCTTTGACCTGCTTGACGCACTGTTCCATTCCGAGAGAGCTTTTCTCCAG
 CAGCGCTGGAATGGCGTTCTCTGAGAAATTCGGTGAAGCTGATTCAAAAG
 ACTTTACGCGAAGAGAGTCTTTAAGCGACTTGCAAGTAAGTTTGGACCGCTC
 CTGGCGAGTTGGCGCGCTGTCAGCGCTTCCGGAAGCAGATTGCGACAGT
 AAGCGCGGACAGGCTCGCGAAGCGCTTTGCTTTAAGCGCTTTCACAGATTTC
 GTCTAAACTGCTTACTGACCTGACCAAGTTTACACCGAATGCTGCCAGCGGAGCTT XbaI
 ACCAATGACTGCACTGCTTCAACTGCGCTTACGAGCGTGGCGCTGGAAGATC

【図18E】

ブロック5

XbaI

CTAGAGTGGCAGACGACCTGGGACCTGGCGAATACATCTCGAAAAACAGGACTCCAT
 TCAAGCGCTCTGCTGGCAGCTTCGACCGCTTTATGTAGAGCTTTTGTCTGAGGTAGAGAAT

CTTTCTAAACTGAAGAATCTGCGAAAAACCGCTGCTGGAATACTCACTGCACTGCAAGAA
 TTGACTTTCTTACGACGCTTTTGGGACGACCTTTTACAGTGACCTAGCGCTTTCATCTTT
 GTAGAAAACGCAAAATGCGCGCGGATCTGCGCTCTCTGCGCGCTGACTTCTTCAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 GTGTGCAAAACTACGCAAGCAAAAGAGCTATTCTAGCTATGTTCTGTACCAATACGCTCG XbaI
 TTTGATGCTCTTCTGCTTTCTGATAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGGACCT

【図18F】

ブロック6

SalI

CTGCAAAAAATGCTGCGGAGAGCTGCTGCTGGAATACTCACTGCACTGCAAGAA
 TTGACTTTCTTACGACGCTTTTGGGACGACCTTTTACAGTGACCTAGCGCTTTCATCTTT
 GTAGAAAACGCAAAATGCGCGCGGATCTGCGCTCTCTGCGCGCTGACTTCTTCAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 GTGTGCAAAACTACGCAAGCAAAAGAGCTATTCTAGCTATGTTCTGTACCAATACGCTCG XbaI
 TTTGATGCTCTTCTGCTTTCTGATAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGGACCT

【図18G】

ブロック7

EcoRI

CTAGAGTGGCAGACGACCTGGGACCTGGCGAATACATCTCGAAAAACAGGACTCCAT
 TCAAGCGCTCTGCTGGCAGCTTCGACCGCTTTATGTAGAGCTTTTGTCTGAGGTAGAGAAT
 CTGCAAAAAATGCTGCGGAGAGCTGCTGCTGGAATACTCACTGCACTGCAAGAA
 TTGACTTTCTTACGACGCTTTTGGGACGACCTTTTACAGTGACCTAGCGCTTTCATCTTT
 GTAGAAAACGCAAAATGCGCGCGGATCTGCGCTCTCTGCGCGCTGACTTCTTCAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 GTGTGCAAAACTACGCAAGCAAAAGAGCTATTCTAGCTATGTTCTGTACCAATACGCTCG XbaI
 TTTGATGCTCTTCTGCTTTCTGATAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGGACCT

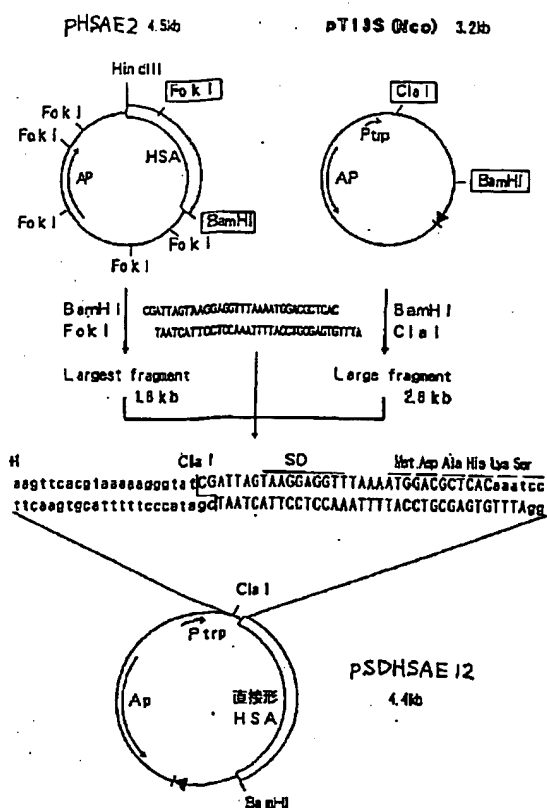
【図18H】

ブロック8

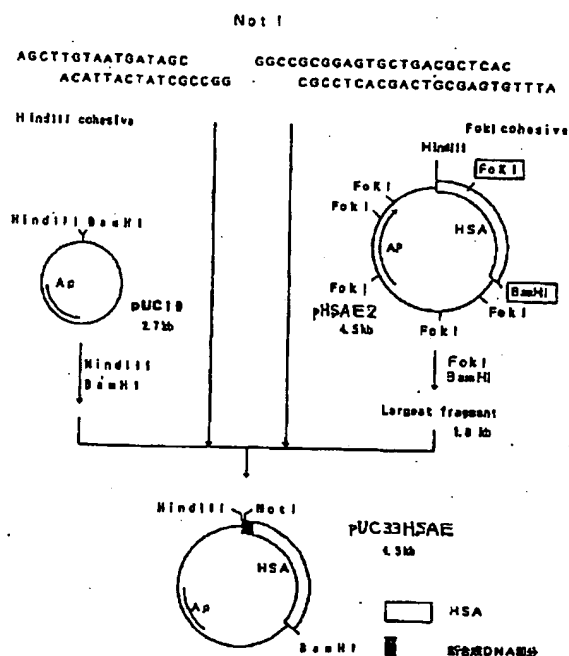
XbaI

CTAGAGTGGCAGACGACCTGGGACCTGGCGAATACATCTCGAAAAACAGGACTCCAT
 TCAAGCGCTCTGCTGGCAGCTTCGACCGCTTTATGTAGAGCTTTTGTCTGAGGTAGAGAAT
 CTGCAAAAAATGCTGCGGAGAGCTGCTGCTGGAATACTCACTGCACTGCAAGAA
 TTGACTTTCTTACGACGCTTTTGGGACGACCTTTTACAGTGACCTAGCGCTTTCATCTTT
 GTAGAAAACGCAAAATGCGCGCGGATCTGCGCTCTCTGCGCGCTGACTTCTTCAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 GTGTGCAAAACTACGCAAGCAAAAGAGCTATTCTAGCTATGTTCTGTACCAATACGCTCG XbaI
 TTTGATGCTCTTCTGCTTTCTGATAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGGACCT

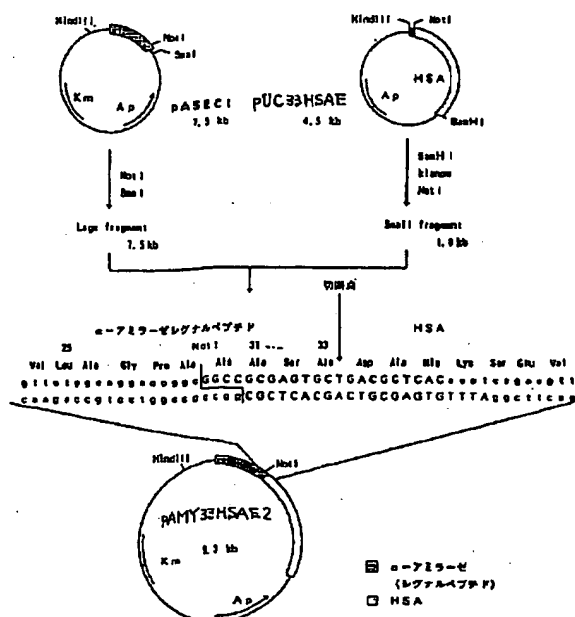
【図19】



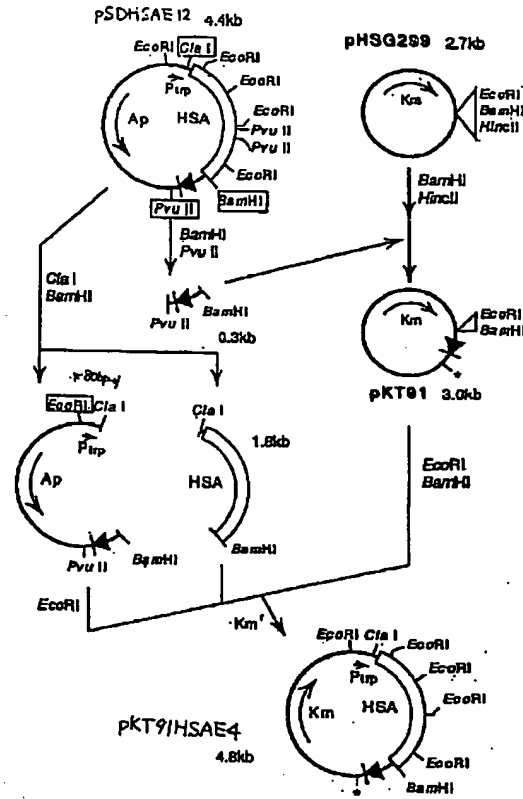
【図20】



【図21】



【図22】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:125)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:125)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:08)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.